Die Beeinflussung des Wachstums über den intermediären Stoffwechsel durch Chlortetracyclin bei keimfrei und konventionell gehaltenen Küken

Herwig Schmidt

1967

Aus dem Institut für Tierphysiologie der Universität München
Vorstand: Professor Dr. Dr. Dr. h. c. Johannes BRÜGGEMANN

DIE BEEINFLUSSUNG DES WACHSTUMS ÜBER DEN INTERMEDIÄREN STOFFWECHSEL DURCH CHLORTETRACYCLIN BEI KEIMFREI UND KONVENTIONELL GEHALTENEN KÜKEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Herwig Schmidt
aus Tachau/Sudetenland

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. A. HERRLICH
Referent: Univ.Doz. Dr. M. MERKENSCHLAGER
Korreferent: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Johs. BRÜGGEMANN

Tag der Promotion: 28. Juli 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNI-Druck, München 13, Amalienstraße 85

MEINEN ELTERN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546019_0072

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
LITERATUR	3
MATERIAL UND METHODIK	9
Tiermaterial	9
Tierhaltung	9
Messung der Enzymaktivitäten	12
ERGEBNISSE	17
DISKUSSION	32
ZUSAMMENFASSUNG	35
LITERATURVERZEICHNIS	39
LEBENSLAUF	

EINLEITUNG

In den Jahren 1949/50 berichteten STOCKSTAD und Mitarbeiter, daß durch Beifütterung von Chlortetracyclin eine vermehrte Gewichtszunahme bei Küken und Schweinen zu erreichen ist (1, 2). Anschließend durchgeführte Untersuchungen befaßten sich zum großen Teil mit der Wirkungsweise dieser Verbindungen auf das Wachstum. Die Vielfalt der hier vorliegenden Einzelergebnisse läßt sich jedoch nur schwer in ein System bringen, da bei der Durchführung und Überprüfung dieser Versuche oft Tierart und -haltung, Jahreszeit und Futterzusammensetzung unterschiedlich waren. Allerdings dominierte immer die Ansicht, daß die vermehrte Gewichtszunahme durch die antibakterielle Wirkung dieser Verbindungen auf schädliche Darmsymbionten und damit der Schaffung einer günstigeren Bakterienflora im Verdauungstrakt zu erklären sei. Zur Stützung dieser Annahme wurde im wesentlichen angeführt, daß unter optimalen hygienischen Aufzuchtbedingungen keine Wachstumsvermehrung durch eine Antibiotikabeifütterung zu erreichen ist und daß bei Steriltieren eher eine geringgradige Verminderung der Gewichtszunahme beobachtet werden kann. Besonders das letzte Experiment schien von einer derart großen Beweiskraft zu sein, daß alle die Untersuchungen, deren Ergebnisse die Ursachen des Wachstumseffektes in den intermediären Stoffwechsel verlegten, praktisch nicht mehr diskutiert wurden.

Konventionell gehaltene Tiere wachsen in der Tat um 10 - 20 % langsamer als Steriltiere (3, 4). Die Darmflora bedeutet demnach - ebenso wie schlechte Umweltbedingungen - für den Organismus eine wachstumsdepressive Belastung. Es ist allerdings übersehen worden, daß die mehr oder weniger vollkommene Aufhebung dieser Belastung durch eine Antibiotikazufütterung theoretisch auf zwei Wegen möglich ist (SCHOLE (5)): Entweder werden schädliche Mikroorganismen durch direkte antibiotische Wirkung ausgeschaltet und dadurch die Abwehr- und Entgiftungsfunktionen indirekt entlastet (indirekter Stoffwechseleffekt) oder das Antibiotikum wird resorbiert und verstärkt durch direkte Beeinflussung der Reaktionslage - vergleichbar mit der Resistenzerhöhung durch Wachstumshormon (6) - die Abwehrkräfte des Organismus (direkter Stoffwechseleffekt). Welche von beiden Alternativen zutrifft, läßt sich nur durch Versuche an Steriltieren entscheiden, deren Wachstumsgeschwindigkeit unter sterilen Bedingungen auf das Niveau der Konventionaltiere gesenkt wird. Erst dann liegen für Steril- und Kon-

ventionaltierversuch vergleichbare Bedingungen vor. In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, verschiedene Möglichkeiten einer sterilen Wachstumsdepression bei keimfreien Küken zu erproben und anschließend durch entsprechende Antibiotikazulagen zwischen den oben skizzierten theoretischen Möglichkeiten zu entscheiden.

LITERATUR

Von der großen Zahl der in der Therapie zur Anwendung kommenden Antibiotika werden nur einige als Zusatzstoffe in der Nutztierfütterung verwendet. Für die Auswahl und die Erlaubnis einer Verwendung der einzelnen Substanzen sind allgemeinhygienische Gesichtspunkte und in erster Linie Beweise einer zuverlässigen Brauchbarkeit für den vorgesehenen Verwendungszweck, der in folgenden Wirkungen besteht, ausschlaggebend:

1. Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit,
2. Verbesserung der Futterverwertung,
3. Sparwirkung an essentiellen Nährstoffen,
4. Senkung der Aufzuchtverluste und
5. Steigerung oder Erhaltung einer Leistung, z. B. der Legeleistung.

Die Größe dieser Effekte steht in umgekehrtem Verhältnis zu den Haltungsbedingungen, d. h. je günstiger die Haltungsbedingungen gestaltet werden, um so geringer ist die Wirkung der Antibiotikazufütterung. Man hat die Güte der Umweltbedingungen auch als "Disease level" (7), später umfassender als "Stress level" (CATRON (8 - 13)) bezeichnet. Demnach ist das Ausmaß der Antibiotikumwirkung von der Stress-Situation des jeweiligen Organismus abhängig.

Eine Stress-Situation wird in der Mehrzahl der Fälle durch Mikroorganismen ausgelöst oder kann zumindest - wie z. B. beim Kältestress - durch Mikroorganismen verstärkt werden (Sekundärinfektion). Da die verwendeten Verbindungen als "antibakteriell" wirksame Verbindungen bekannt wurden, ist es nur zu verständlich, daß die Wirkungsweise im Bereich der antibakteriellen Wirkung gesucht wurde. In der Tat ist die Beeinflussung der Darmflora durch die Fütterungsantibiotika heute unbestritten. Die Zahl der Arbeiten, die sich mit dieser Problematik befaßt haben, ist so außerordentlich groß, daß hier nur ein ganz kurzer Überblick über die wichtigsten prinzipiellen Ergebnisse möglich ist. Der größte Teil dieser Versuche wurde mit den Tetracyclinen oder mit Penicillin durchgeführt. Als Versuchstiere wurden neben Laboratoriumstieren Schweine und Geflügel bevorzugt. Man folgte im wesentlichen der Arbeitshypothese, daß günstige Darmsymbionten vermehrt und ungünstige vermindert würden.

Zum ersten Gesichtspunkt - der Vermehrung günstiger Darmmikroben - wurde experimentell gefunden, daß bei Antibiotikazufütterung die coliformen Keime und die Laktobazillen zunehmen (14 - 32). Auch das Verhältnis der Coliformen zu Laktobazillen scheint sich zugunsten der Coliformen zu verschieben (33 - 37). Da das Bakterium coli essentielle Aminosäuren und Vitamine zu synthetisieren vermag, wäre eine Rückwirkung auf das Wachstum durch Vermehrung dieses Keimes denkbar. Die für praktisch alle wasserlöslichen Vitamine nachgewiesene Sparwirkung, die durch Antibiotikazufütterung erzielt werden kann, wird entsprechend als Erhöhung der enteralen Vitaminsynthese gedeutet (38 - 52).

Zur Stützung des zweiten Gesichtspunktes - der Unterdrückung ungünstiger Keime - wurde im wesentlichen eine Ausmerzung toxinbildender, ubiquitär vorkommender Clostridien beobachtet, die im Infektionsversuch eine Vermehrung der reticuloendothelialen Zellen in der Darmwand bewirken (53), also offensichtlich die Abwehrreaktionen des Organismus erhöhen (54 - 59). Andere Autoren sahen eine Abnahme der Enterokokkenzahl im Darm (60 bis 63). Außerdem wurde eine Hemmung der Laktobazillen im Kropf des Geflügels festgestellt (64).

MERKENSCHLAGER (65) kommt aufgrund eigener, systematischer Untersuchungen zu dem Schluß, daß eine Wirkung der Fütterungsantibiotika auf die Darmflora zwar nicht zu leugnen sei, daß es aber als verfrüht bezeichnet werden müßte, mit Hilfe der Befunde über Veränderungen der Bakterienmasse oder einzelner Keimarten den Wachstumseffekt erklären zu wollen. Als Begründung wird angeführt, daß die bakteriologische Technik noch keineswegs vollkommen ist und daß die bisherigen Kenntnisse vom Wesen und einem eventuellen Nutzen der Flora nicht ausreichen. Auch ist die Darmbakteriologie noch nicht in der Lage, mit Hilfe künstlicher Nährmedien ein wahres Spiegelbild der Mikroorganismenarten zu geben. Überlagerungen und Interferenzen sind daher nicht zu vermeiden und nur schwer zu beurteilen.

So verbleibt als Hauptargument für eine "antibiotische" Wachstumsbeeinflussung auf dem Wege über die Darmflora die schon eingangs erwähnte Tatsache, daß keimfreie Tiere durch Antibiotikazulagen zum Futter eher im Wachstum gedrückt werden. Auch nach Inokulieren von Aureomycin in bebrütete Hühnereier ist eine verminderte Gewichtszunahme der Embryonen beobachtet worden (66). Untersuchungen von LUCKEY (67 - 80) zeigen

allerdings, daß auch hier die Ergebnisse nicht einheitlich sind; Durch Senkung der Antibiotikumdosierung unter den üblichen Bereich von 10 mg/kg Futter konnten auch bei Steriltieren Wuchseffekte erhalten werden. Leider waren die gemessenen Ausschläge unterschiedlich hoch und daher nur schwer statistisch zu sichern.

Eine wesentlich kleinere Zahl von Untersuchern hat sich mit der an zweiter Stelle aufzuwerfenden Frage beschäftigt, ob diesen Verbindungen nicht trotz der Tatsache, daß sie für antibakterielle Wirkungen prädestiniert zu sein scheinen, eine direkte Wirksamkeit im intermediären Stoffwechsel zuerkannt werden muß. Auch hier wurden die meisten Versuche mit den Tetracyclinen und Penicillin durchgeführt, ohne daß hinsichtlich der beobachteten Effekte prinzipielle Unterschiede zwischen diesen Verbindungen festgestellt werden konnten. Als Versuchstiere dienten vorwiegend Ratte und Hund; zahlreiche Beobachtungen stammen auch aus der Humantherapie.

Der Einfluß auf Blutdruck, Kreislauf, Herz, Leber, Blutbild, Blutzucker, Blutgerinnung, Serumeiweißkörper, Immunität und Atmung wird unterschiedlich beurteilt, weil die registrierten Phänomene auch als Sekundäreffekte nach vorhergegangener Bakterienbeeinflussung aufgefaßt werden können. Ähnliches gilt für beobachtete Verbesserungen des Calcium- und Phosphathaushaltes (81 - 89) und für eine erhöhte Spurenelementretention (89 - 91). Auch die Senkung der Mortalität nach intensiver Röntgenbestrahlung durch Zuführung von Chlortetracyclin (92 - 94) kann als Unterdrückung von Sekundärinfektionen gedeutet werden. Entsprechendes gilt für die günstige Wirkung des Aureomycins nach Splenektomie (95).

Ganz anders sind dagegen die Effekte zu beurteilen, die im Endokrinium - insbesondere an Nebennierenrinde und Schilddrüse - sicher nachgewiesen worden sind. So konnten MELLEN und WALLER (96) sowie MENGE und CONNER (97) beim Huhn durch Zugaben von 10 - 1000 mg Aureomycin/kg Futter eine signifikante Vergrößerung der Schilddrüse bewirken. Die Zunahme des Drüsengewichtes stand bis zu einer Menge von 100 mg pro kg Futter in direkter Beziehung zu der angewendeten Aureomycinmenge. SCHOLE (5) fand entsprechend bei Aureomycinzufütterung eine gesicherte Zunahme der Thyroxinwirksamkeit an der Atmungskette, die als Steigerung des zellulären Thyroxinspiegels gedeutet werden kann.

Auch die Nebennierenrinde (NNR) wird durch Antibiotikagaben stimuliert, wie durch Bestimmung des Drüsengewichtes, des Ascorbinsäuregehaltes und der Zellkerndurchmesser der äußeren Rindentransformationszone bewiesen werden konnte (98 - 102). Der Eosinophilensturz nach hohen Penicillingaben weist in dieselbe Richtung (103). Entsprechend wurde ein Ansteigen der Rest-N-Werte im Serum beobachtet (104).

Andererseits sind vollkommen adrenalektomierte Ratten außerordentlich aureomycinempfindlich. Cortison hebt diesen Effekt auf (105). Durch dieses Ergebnis weist sich das Aureomycin als Antagonist der NNR-Hormone aus. Ebenso gelang es, eine Wachstumsdepression, die bei jungen Ratten durch Cortison ausgelöst wurde, mit Aureomycin zu kompensieren (106). Entsprechend konnte die antithyreoidale Wirkung im Kaulquappentest demonstriert werden (107 - 109). Diese nach Antibiotikafütterung beobachteten endokrinen Veränderungen sind demnach als gegenregulatorische Intensivierung der NNR- und Schilddrüsenfunktion in Beantwortung einer anticorticoiden und antithyreoidalen Stoffwechselwirkung dieser Verbindungen zu deuten.

Durch eine antibakterielle Wirkung sind diese Vorgänge nicht zu erklären. SCHOLE (110) hat schon 1955 auf folgende Zusammenhänge aufmerksam gemacht: Die NNR-Aktivität nimmt mit steigendem Stress-level zu. Erwartungsgemäß wurden bei Steriltieren besonders kleine Nebennieren gefunden. Wenn sich der Organismus also durch Senkung des Stress-levels - d. h. durch Hemmung oder Ausmerzung schädlicher Mikroben durch Antibiotika - dem Zustand der Steriltiere annähern würde, dann müßte eine Senkung der NNR-Funktion zu erwarten sein. Das Gegenteil wird aber beobachtet. Da ein ausschließliches Ansteigen kataboler Drüsenfunktionen zu meßbarer Wachstumsdepression führen müßte, kann mit Sicherheit angenommen werden, daß diese erhöhte Hormonwirksamkeit zumindest voll kompensiert ist. Tatsächlich sind die Thymusgewichte - ein sehr empfindlicher Indikator für die NNR-Wirksamkeit - bei aureomycingefütterten Ratten trotz gesteigerter NNR-Funktion höher als bei entsprechenden Kontrolltieren (KARG (111)). Für diese Kompensation kommen einerseits anabole Regulatoren (Wachstumshormon (STH) und Insulin), deren Bildung und Sekretion durch die Antibiotikumwirkung auf den Stoffwechsel ebenfalls stimuliert werden könnte, oder das Antibiotikum selbst in Frage. Beide Möglichkeiten scheinen von Bedeutung zu sein, wie noch zu zeigen sein wird.

Noch eine weitere Versuchsreihe von SCHOLE und Mitarbeitern spricht für einen direkten Stoffwechseleffekt der Antibiotika. Die Untersuchungen bauen auf einem Experiment von MULLI und Mitarbeitern auf, nach dem der Citratabbau in Lebermitochondrien durch sehr kleine Chlortetracyclinkonzentrationen (<1 mcg/ml) gehemmt wird. SCHOLE (112) konnte zeigen, daß dieser Effekt auf einer spezifischen Inhibierung der Bernsteinsäuredehydrogenase - also des einzigen Flavinenzyms dieses Kreisprozesses - beruht. Alle anderen Enzyme des Citratcyklus werden nicht beeinflußt. Weitere Versuche führten dann zu dem Ergebnis, daß alle gelben Fermente der Mitochondrien durch die Antibiotika gehemmt werden, die Bernsteinsäuredehydrogenase sogar erst an letzter Stelle. Am stärksten werden die L-Aminosäureoxydase, die bevorzugt essentielle Aminosäuren desaminiert, und an zweiter Stelle die Flavinenzyme des Fettsäurecyklus (Acyldehydrogenasen) und der Atmungskette erfaßt. Durch Parallelanalysen ergab sich, daß andere, ebenfalls als wachstumswirksam erkannte Verbindungen (Vitamin T (GÖTSCH), Vitamin A und E sowie Orotsäure und Kupfersulfat), denen dieselben, zu Beginn der Literaturübersicht (S. 3) aufgeführten Einflüsse auf die Nutztieraufzucht zuzuerkennen sind, die Aktivität der mitochondrialen Flavinenzyme wie die Antibiotika beeinflussen. Schließlich konnte auch noch experimentell nachgewiesen werden, daß die anabolen Hormone (STH, Insulin, Östradiol) ihre Wirksamkeit an denselben Enzymsystemen entfalten. Hierdurch wird die Wahrscheinlichkeit außerordentlich groß, daß die Antibiotika in dieser Wirkstoffreihe keine Sonderstellung einnehmen (5). Ihre Krönung fand diese Versuchsreihe in der experimentell nachgewiesenen Aktivitätssteigerung dieser Enzymgruppe durch die Hormone der NNR. Dadurch wird der direkte Antagonismus der wachstumsfördernden Substanzen zur NNR auf molekularer Basis verständlich.

Auch die Beeinflussung der Schilddrüsenfunktion - bestimmt durch Messung der Geschwindigkeit des Elektronentransportes vom Cytochrom c zum Sauerstoff, der durch die Schilddrüsenhormone offensichtlich spezifisch kontrolliert wird - gilt für alle in diesem Zusammenhang überprüften anabolen Hormone und wachstumsfördernden Substanzen (5). Nach diesen Ergebnissen besteht der durch Antibiotikagaben erzielbare Wachstumseffekt - vergleichbar mit anderen synthesefördernden Verbindungen - in einer direkten Steigerung der anabolen Hormonwirksamkeit im intermediären Stoffwechsel. Durch die parallel laufende Erhöhung des Thyroxinspiegels wird gleichzeitig eine ausreichende Energiebildung an der Atmungs-

kette garantiert. Da sich die STH-Wirkung in erster Linie auf das mesenchymale Gewebe erstreckt, das die gesamte Abwehrfunktion eines Organismus beherbergt, muß mit diesem anabolen Effekt auch eine - von der "antibiotischen" Wirkung völlig unabhängige - Resistenzsteigerung verknüpft sein.

Alle diese zuletzt kurz skizzierten Versuche und Überlegungen haben allerdings nicht ausgereicht, das allein überzeugende Experiment der fehlenden Antibiotikumwirkung am keimfreien Tier zu entthronen. Es waren daher - wie schon eingangs erwähnt wurde - Untersuchungen an Steriltieren erforderlich, die durch sterile Stressfaktoren auf die Wachstumsgeschwindigkeit von Konventionaltieren eingestellt werden. Es sollte daher in der vorliegenden Arbeit versucht werden, Stressoren herauszufinden, die das Wachstum eines Sterilkükens um 10 - 20% drücken. Diese Depression war dann durch Antibiotikazulage auszugleichen. Läßt sich der Ausgleich erreichen, so kann das Ergebnis als Beweis der Stoffwechselwirkung aufgefaßt werden. Außerdem war vorgesehen, die Aktivitäten der erwähnten Flavinenzyme und die Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation (Schilddrüsenfunktion!) mitzuerfassen, um festzustellen, ob die Beeinflussung dieser Größen durch die Antibiotika bei Konventional- und im Wachstum entsprechend angeglichenen Steriltieren einheitlich ist.

MATERIAL UND METHODIK

Tiermaterial: Alle Versuche wurden mit Küken der Mastrasse Nichols-Lohmann durchgeführt. Für ausschließlich konventionelle Versuche wurden Eintagsküken bezogen. Die Küken wurden nach Geschlechtern getrennt geliefert. Vorversuche zeigten aber, daß unter den hier gewählten Bedingungen keine Geschlechtsunterschiede zu erwarten sind, so daß dieser Punkt unberücksichtigt bleiben konnte.

Für die Gewinnung keimfreier Tiere standen Bruteier zur Verfügung. Die Schalenoberfläche gewichtssortierter Eier wurde vor dem Einlegen in den mit Formaldehyd desinfizierten Brüter mit 2%iger Peressigsäure sterilisiert. Nach achtzehntägiger Brut erfolgte eine Überführung der Eier mit erneuter Peressigsäure-Oberflächensterilisation in Sterileinheiten. Der Schlupf erfolgte in den Plastik-Keimfreiisolatoren. In den Isolatoren geschlüpfte, überzählige Tiere wurden ausgeschleust und fanden in konventionell gehaltenen Vergleichsgruppen Verwendung.

Tierhaltung: Die konventionelle Haltung erfolgte in heizbaren Käfigen auf Drahtgitter. In ausschließlich konventioneller Haltung wurde ein in der Praxis übliches Futter, im Text als Futter Nr. 1 bezeichnet, folgender Zusammensetzung verabreicht:

Maisschrot	58,0 %
Sojaschrot, getoastet	32,1 %
Trockenmolke	2,0 %
Fischsolubles	1,0 %
Dicalciumphosphat	2,5 %
Calciumcarbonat	1,0 %
Kochsalz	0,4 %
Vormischung	3,0 %

Vormischung pro kg Futter:

Vitamin D_3	1000 IE	Pantothensäure	5 mg
Vitamin B_2	3 mg	Nicotinsäure	30 mg
Vitamin B_{12}	10 mcg	Cholinchlorid	100 mg
Vitamin K_3	1 mg	Mangansulfat	200 mg

mit Sojaschrot, getoastet ad 1,5 kg

Die Möglichkeit der Futter- und Wasseraufnahme war unbegrenzt.

In den Plastik-Sterileinheiten wurden je zwei Gruppen zu je 6 Tieren in Käfigen aus Plexiglas auf Metallgittern gehalten (Abb. 1, S. 11). Ab dem zweiten Lebenstag erhielten die Tiere steriles Futter und Wasser ad libitum. Das Futter, im weiteren Text mit Nr. 2 bezeichnet, bestand aus folgenden Komponenten:

Maisstärke	45 %
Sojaprotein	35 %
Sojaöl, raffin.	10 %
Mineralsalzmischung	6 %
Vitaminvormischung	2 %
Zellulose	2 %

Mineralsalzmischung,		g/kg Endfuttermischung:	
CaCO	15	Eisencitrat	0,45
$Ca_3(PO_4)_2$	14	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,45
K_2HPO_4 siccum	10	$ZnCO_3$	0,04
NaCl	8	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,02
Na_2HPO_4 siccum	7	KJ	0,04
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	5		

Die Vitaminzusätze waren so hoch, daß trotz der Sterilisationsverluste der Bedarf der Tiere noch gedeckt wurde. Die Konzentration an Vitaminen und Methionin betrugen vor der Sterilisation pro kg Endfutter:

Vitamin A	7200 IE	Pantothensäure	13,3 mg
Vitamin D_3	560 IE	Nicotinsäure	36,0 mg
Vitamin E	60 mg	Biotin	0,14 mg
Vitamin K_1	1,2 mg	Folsäure	1,60 mg
Thiamin	25 mg	Vitamin B_{12}	0,02 mg
Pyridoxin	4,0 mg	Methionin	3,00 g
Riboflavin	7,0 mg	Cholin	2,00 g

Das Ausmaß der Vitamin-Hitzeinaktivierung wird im Institut laufend kontrolliert. Im Zeitraum der Versuchsanstellung betrugen die Vitaminverluste in der Futtermischung bei dem angewandten Sterilisationsvorgang: Vitamin A 25 %, Vitamin E 35 %, Thiamin 50 %, Riboflavin 25 %, Pantothensäure 20 %, Nicotinsäure 5 %, Cyanocobalamin 20 %, Cholin 0 %. Vom Methioninzusatz wurden 33 % zerstört.

Abbildung 1

Plastik-Sterileinheiten des Tierphysiologischen Institutes

Die Sterilisation des Futters erfolgte in dünner Schicht bei 134°C über 5 Minuten im Autoklaven.

Als Antibiotikum wurde bei diesen Versuchen nur Chlortetracyclin (Aureomycin) verwendet, das steril filtriert in die Einheiten gebracht und erst hier in den vorgesehenen Konzentrationen (s.u.) dem Futter beigemischt wurde. Die Wägung der Tiere in den Isolatoren wurde täglich auf Briefwaagen durchgeführt. Die konventionell gehaltenen Tiere wurden auf einer herkömmlichen Waage gewogen.

Messung der Enzymaktivitäten: Aus arbeitstechnischen Gründen konnten bei den Enzymaktivitätsbestimmungen aus gewaschenen Mitochondrien nur jeweils sechs Tiere, aus Homogenaten höchstens acht Tiere in einem Untersuchungsgang ausgewertet werden. Um bei derart kleinen Versuchsgruppen möglichst einheitliche Ergebnisse zu erhalten, mußte nicht nur auf gleiche Größe und Wachstumsgeschwindigkeit geachtet, sondern auch die Tötung ohne wesentliche Aufregungen für das Tier durchgeführt werden. In zahlreichen Vorversuchen zeigte es sich, daß schon eine gewisse Unruhe vor der Tötung Streuungen bewirkte. Die in dieser Arbeit ausgegebenen Meßwerte stammen von Küken, denen beim Ergreifen der Kopf abgerissen wurde. So abstoßend diese Methode auch erscheinen mag, für das Geflügel ist es zweifellos eine ideale Tötungsart, und die Übereinstimmung der Untersuchungsergebnisse ist sehr gut. Nach Möglichkeit wurden die Aktivitäten der Bernsteinsäuredehydrogenase, der Butyryl- und Capryldehydrogenase, der L-Aminosäureoxydase und der NADH-Cytochrom-c-Reduktase bestimmt; außerdem wurde die Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation erfaßt.

Herstellung der Homogenate und Mitochondriensuspensionen:

1. Homogenat: 600 mg Kükenleber wurden in 5 ml Rohrzuckerlösung (17 g Rohrzucker ad 200 ml Aqua bidest.) bei 0° 40 Sekunden im Bühler-Homogenisator zerschlagen; anschließend wurde 5 Minuten bei 3500 Upm zentrifugiert, um die größeren Zellbestandteile zu sedimentieren. Der Überstand diente zur Bestimmung der Cytochrom-c-Oxydation und der NADH-Cytochrom-c-Reduktase.

2. Gewaschene Mitochondrien: Die Kükenleber wurde mit gekühlter Rohrzuckerlösung + Titriplex (17 g Rohrzucker und 400 mg Titriplex ad 200 ml Aqua bidest., Neutralisation mit 2 N NaOH) im POTTER-ELVEHJEM homogenisiert und bei 0°C 5 Minuten mit 3000 Upm zentrifugiert, um gröbere

Zellfragmente zu entfernen. Aus dem Überstand wurden in 10 Minuten bei 20 000 Upm die Mitochondrien sedimentiert, das Plasma dekantiert und die Mitochondrien einmal mit kalter Rohrzuckerlösung (ohne Titriplex) gewaschen. Der Überstand wurde abgegossen und der Bodensatz, der überwiegend aus Mitochondrien besteht, in Rohrzuckerlösung suspendiert. Die Verdünnung wurde so gewählt, daß die Mitochondrien von 1 g Leber in 0,85 ml Rohrzuckerlösung enthalten waren. Diese Suspension wurde zur Bestimmung der Flavinenzymaktivitäten, z. T. auch zur Messung der Cytochrom-c-Oxydation, verwendet.

Bei der Durchführung der Messung ist zu berücksichtigen, daß grundsätzlich Überlagerungen mit anderen Fermentreaktionen, die im gewissen Umfang bei allen Bestimmungen von Enzymaktivitäten sowohl in Gewebehomogenaten als auch in Mitochondriensuspensionen auftreten, eine vollkommene Spezifität noch vermissen lassen. Es ist also in jedem Falle ein Blindwert in Abzug zu bringen. Dies gilt besonders für die Bestimmung der L-Aminosäureoxydase. Um die Ungenauigkeit möglichst klein zu halten, wurde L-Leucin als Substrat verwendet, das durch Transaminasen praktisch nicht umgesetzt wird. Zur Messung aller Flavinenzyme wurde der Thunberg-Test verwendet, da sich die Fermentreaktionen leicht anhand der Formazanbildung aus Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) in Gegenwart von Methylenblau verfolgen lassen. Die Bestimmung läßt sich bequem in Zentrifugengläsern ausführen. Da die Kontrollwerte in den Vorversuchen sehr einheitlich waren, wurden je Tier und Enzym zwei Kontroll- und vier Versuchsproben angesetzt. Folgender Ansatz wurde verwendet:

0,04 ml	0,2%	Methylenblau
0,12 ml	1,0%	Triphenyltetrazoliumchlorid
0,16 ml		Trispuffer pH 8,2
0,10 ml		Mitochondriensuspension

Zur Bestimmung der

a) Bernsteinsäuredehydrogenase wurden außerdem 0,1 ml einer 1,04%igen Bernsteinsäurelösung, zur Bestimmung der

b) Butyryldehydrogenase 0,1 ml Butyrylcysteamin (Modellsubstanz nach LYNEN (0,04 M)) und zur Bestimmung der

c) Capryldehydrogenase 0,1 ml Caprylcysteamin (0,04 M) als Substrat zugesetzt.

In alle Kontrollgläser wurde 0,1 ml Aqua bidest. pipettiert. Zur Messung der L-Aminosäureoxydase wurde der Ansatz folgendermaßen variiert:

Kontrollen:

0,04 ml	0,2 % Methylenblau
0,12 ml	0,5 % Tetrazolpurpur
0,10 ml	Trispuffer pH 8,2 mit Hydroxylammoniumsulfat (Endkonz. 10^{-3} M)
0,06 ml	Trispuffer pH 8,2 mit Hydroxylammoniumsulfat + NH_4^+ (Endkonz. 10^{-1} M)
0,10 ml	2,07 % L-Leucinlösung
0,10 ml	Mitochondriensuspension

Die NH_4-Ionen hemmen das Enzym in dieser Konzentration vollständig.

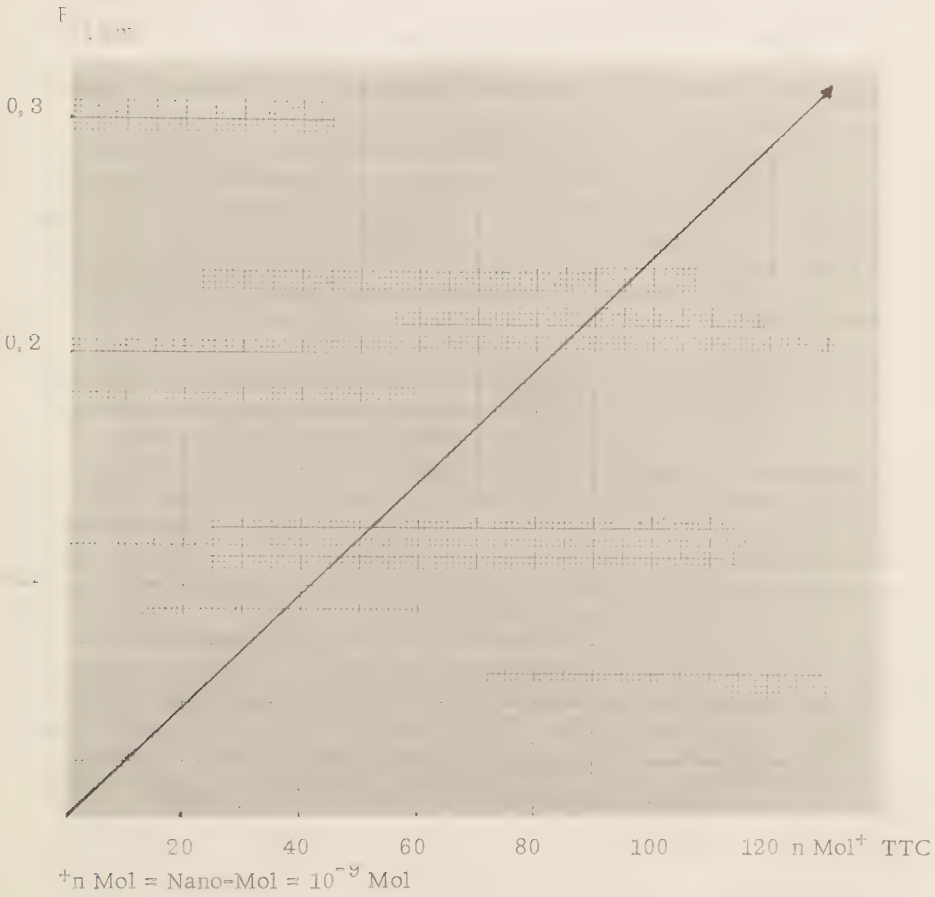
Versuchsproben:

0,04 ml	0,2 % Methylenblau
0,12 ml	0,5 % Tetrazolpurpur
0,16 ml	Trispuffer pH 8,2 mit Hydroxylammoniumsulfat (Endkonz. 10^{-3} M)
0,10 ml	L-Leucinlösung (s.o.)
0,10 ml	Mitochondriensuspension

Die Gläser kamen 60 Minuten in einen Exsiccator, der in einem Wasserbad von 37°C stand und über zwei Kühlfallen mit einer Ölpumpe verbunden war, mit deren Hilfe während der Versuchszeit ein konstanter Unterdruck von 8 mm Quecksilbersäule aufrechterhalten wurde. Nach Ablauf von einer Stunde wurde das Vakuum entfernt und in jedes Glas ein Tropfen 1 N HCl zur Unterbrechung der Fermentreaktionen gegeben. Um das gebildete Formazan photometrisch bestimmen zu können, wurde je Ansatz 1,5 ml Aceton und 4,5 ml Tetrachlorkohlenstoff hinzugefügt und dann 15 Sekunden geschüttelt; durch Zentrifugieren (5 Minuten bei 3500 Upm) wurde die Schichten-Trennung erreicht und der wäßrige Überstand mit Hilfe einer Kapillare an der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die in der organischen Phase vorliegende Rotfärbung wurde im Eppendorf-Photometer (Filter 492 nm) gegen Wasser gemessen (Schichtdicke je nach Anfärbung 1 oder 2 cm). Aus der Eichkurve (Abb. 2, S. 15) konnte die gebildete Formazanmenge abgelesen werden. Die Berechnung erfolgte in n Mol TTC/mg Protein (Kjeldahl-N · 6,25)/Stunde.

Abbildung 2

Eichkurve für Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)



Die Aktivität der NAD-H-Cytochrom-c-Reduktase und die Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation läßt sich direkt im Eppendorf-Photometer verfolgen (Filter 546 nm), da das Cytochrom c im reduzierten und oxydierten Zustand verschiedene spektrale Absorptionsmaxima aufweist (114). Die Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten von Ferro- und Ferri-Cytochrom c beträgt bei 549,5 nm $1,96 \cdot 10^4$.

Nachdem die Mitochondriensuspension bzw. das Gewebe-Homogenat 1 ad 5 mit Rohrzuckerlösung verdünnt 1 1/2 Stunden im Eiswasser gestanden hatte, wurden folgende Ansätze präpariert:

In eine Küvette von 1 cm Schichtdicke wurden pipettiert:

1. Bestimmung der NAD-H-Cytochrom-c-Reduktase:

   0,3 ml Cytochrom-c-Lösung (oxydiert $2 \cdot 10^{-4}$ M = 10,5 mg ad 5 ml Aqua tetradest.)
   0,3 ml NAD-H-Lösung (4 mg ad 5 ml Aqua tetradest.)
   1,14 ml Trispuffer pH 8,5
   0,1 ml verdünnte Mitochondriensuspension oder Leberhomogenat

2. Bestimmung der Cytochrom-c-Oxydation:

   0,3 ml Cytochrom-c-Lösung (s.o.)
   1,44 ml Trispuffer pH 7,4 mit 2,5 mg Titriplex/ml
   0,1 ml verdünnte Mitochrondriensuspension oder Leberhomogenat.

Die Extinktionsänderung von 0,025 entspricht dabei einer Reduktion bzw. Oxydation von 3,1 n Mol Cytochrom c, die jeweils auf 120 Sekunden umgerechnet wurde. Ergab sich diese Extinktionsänderung von 0,025 in x Stunden, so waren das in 120 Sekunden $\frac{3,1 \times 120}{x}$; auch in diesem Fall diente der Proteingehalt als Bezugswert (Kjeldahl-N x 6,25).

Die Ausgangsextinktion der beschriebenen Ansätze beträgt bei 546 nm etwa 0,21. Für die Messung der Cytochrom-c-Oxydation wurde das Cytochrom durch Hinzufügen von Na-Dithionit reduziert und zur Oxydation eines eventuellen Dithionitüberschusses leicht geschüttelt. Die Extinktion steigt durch die Reduktion auf etwa 0,42 an. Durch Zugabe von 0,1 ml Mitochondriensuspension bzw. Leberhomogenat wurde in Test 1 (Reduktase) die Cytochrom-c-Reduktion, in Test 2 (Oxydation) die entsprechende Oxydation des Cytochroms eingeleitet. Gestoppt wurde die Zeit, die beim Durchlaufen einer Extinktionsdifferenz von 0,01, 0,02, 0,025 und 0,05 verstreicht. Bis zu einem ΔE von 0,025 wurde im allgemeinen Linearität beobachtet. Die Berechnung erfolgte aus der Anfangsgeschwindigkeit.

ERGEBNISSE

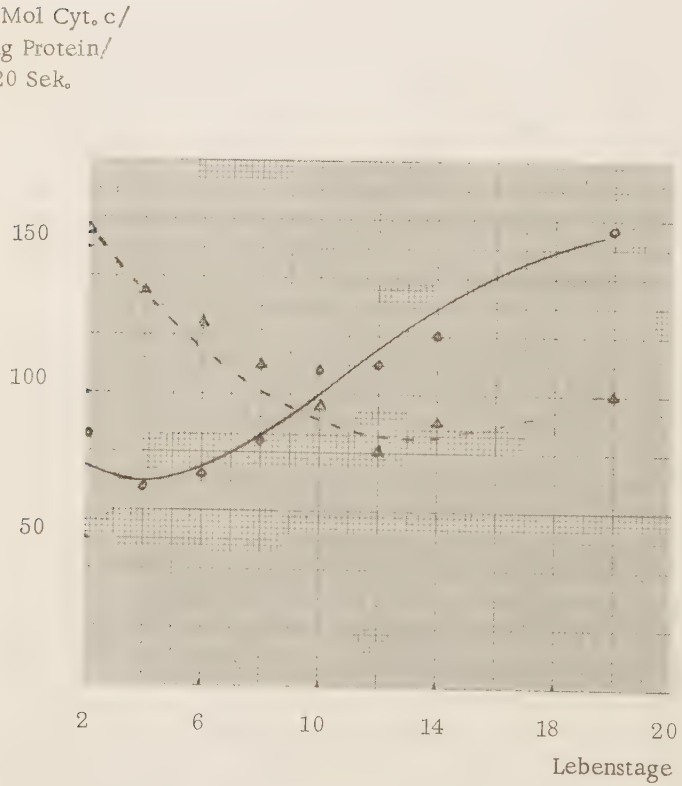
In einem orientierenden Vorversuch wurde bei konventionell gehaltenen Küken die NAD-H-Cytochrom-c-Reduktase und die Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation in Abhängigkeit vom Lebensalter (2. - 30. Lebenstag) bestimmt, um in Erfahrung zu bringen, zu welchem Zeitpunkt die geringsten Streuungen für die enzymatischen Untersuchungen zu erwarten sind. Das ziemlich unerwartete Ergebnis ist in der Abbildung 3 (S. 18) dargestellt: Die Cytochrom-c-Oxydation ist in den ersten Lebenstagen sehr aktiv, durchläuft zwischen dem 10. und 12. Tag ein Minimum und pendelt sich dann auf ein für Synthesen optimales Endniveau ein (vgl. hierzu S. 30). Die Reduktase verhält sich deutlich anders. Ihre Aktivität ist zunächst tief, steigt dann etwa ab 10. Tag langsam an, um ungefähr am 20. Tag ein Plateau zu erreichen (am 30. Tag wurden annähernd dieselben Aktivitäten gemessen wie am 20., nur wurden die Werte nicht mehr eingetragen, um die Übersicht zu erleichtern).

Um größere Streuungen zu vermeiden, wurden die folgenden Versuche so angesetzt, daß die enzymatischen Messungen entweder bis zum 10. oder zwischen dem 18. und 22. Lebenstag vorgenommen werden konnten.

Die erste Versuchsreihe sollte bei konventionell und keimfrei gehaltenen Tieren Unterlagen über die Wachstumsgeschwindigkeit (mit und ohne Aureomycinzulage, 10 mg/kg Futter) und parallel dazu über die Fermentaktivitäten der Leber erbringen. Die erhaltenen Wachstumskurven sind in den Abbildungen 4 und 5 (S. 19 und 20), die Enzymaktivitäten in den Tabellen 1 und 2 (S. 21 und 22) wiedergegeben. Zum Versuchsende (18. bis 22. Lebenstag) war die Wachstumsgeschwindigkeit bei den Konventionaltieren durch die Aureomycinzulage um 17 % erhöht, bei den keimfreien Tieren um 5% vermindert. Aus den erhaltenen Enzymaktivitäten läßt sich entnehmen, daß die Schilddrüsenfunktion (Cytochrom-c-Oxydation) bei den keimfreien Tieren um durchschnittlich 5,5% höher liegt, während sich die Aktivitäten der Bernsteinsäure- und Butyryldehydrogenase erheblich unter denjenigen der Konventionaltiere bewegen. Andererseits ist die Beschleunigung der Cytochrom-c-Oxydation durch die Aureomycinzufütterung bei den keimfreien Tieren geringgradig höher (7,5% gegenüber 6,5% bei den Konventionaltieren), während die Hemmung der Butyryldehydrogenase durch die Aureomycinzulage bei den konventionell gehaltenen Küken wesentlich aus-

Abbildung 3

Das Verhalten der NAD-H-Cytochrom-c-Reduktase und der Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation bei konventionell gehaltenen Küken (Futter Nr. 2) während der ersten 20 Lebenstage



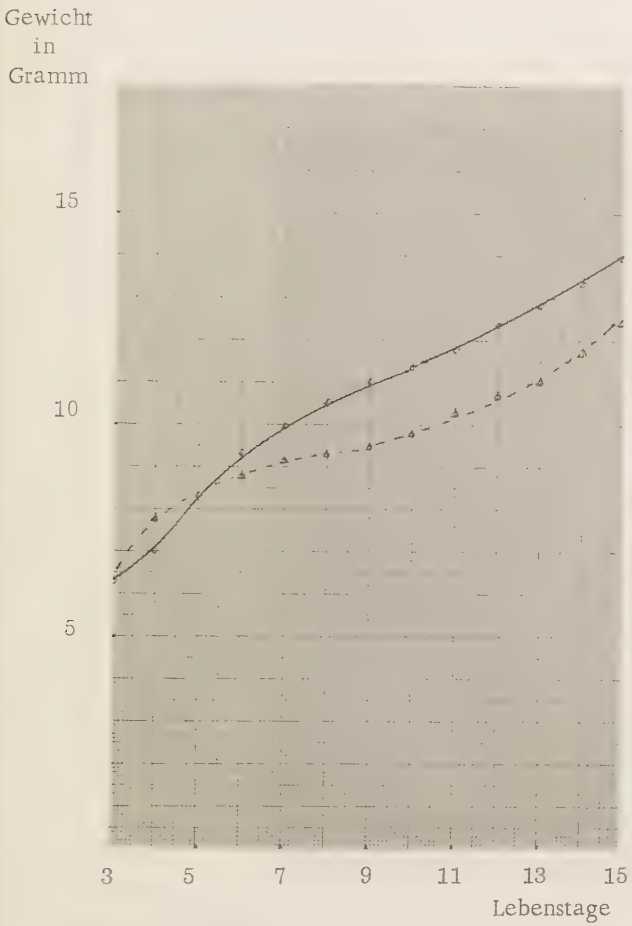
Jeder Punkt als Mittel von 4 Tieren

– – – – – Cytochrom c-Oxydation

——— NAD-H-Cytochrom c-Reduktase

Abbildung 4

Durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme von 60 konventionell gehaltenen Küken mit Futter Nr. 1



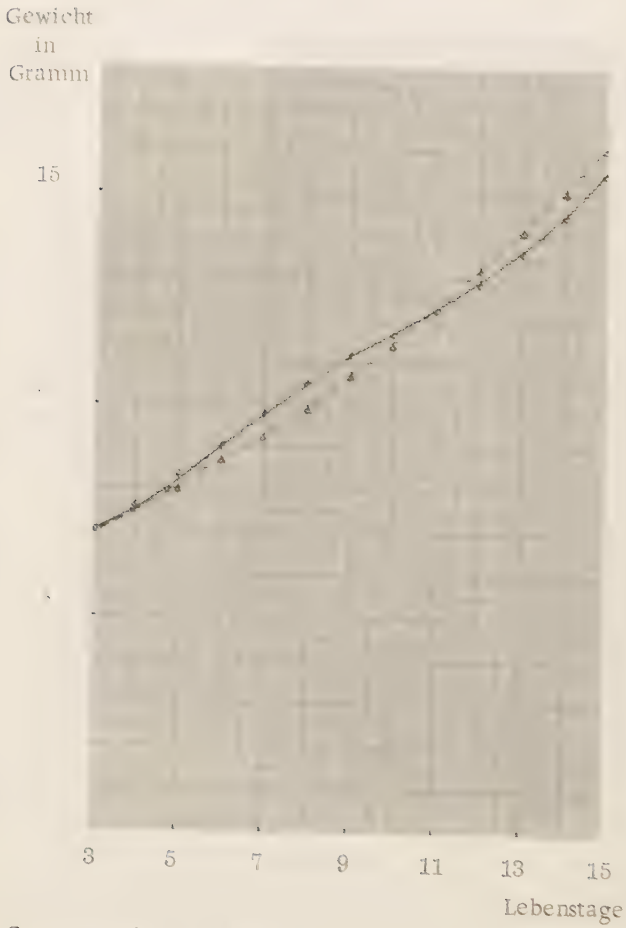
Gruppenstärke 30 Tiere

– △ – △ – Kontrolle

—o—o— + 10 mg Chlortetracyclin (CTC)/kg Futter

Abbildung 5

Durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme von 36 steril gehaltenen Küken mit Futter Nr. 2



Gruppenstärke 18 Tiere

—△—△— Kontrolle

—○—○— + 10 mg CTC/kg Futter

Tabelle 1: Enzymaktivitäten in der Leber konventionell gehaltener Küken (Futter Nr. 1) (jeder Wert als Mittel von 6 Tieren)

Untersuchung nach Lebenstagen	Bernsteinsäure-dehydrogenase		Butyryldehydrogenase		L-Aminosäure-oxydase		NAD-H-Cytochrom-c-Reduktase		Cytochrom-c-Oxydation	
	gemessen in n Mol TTC/mg Protein/Stunde						gemessen in n Mol Cytochrom c reduziert oxydiert pro mg Protein/120 Sekunden			
	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A
18	149 ± 15	140 ± 13	246 ± 15	210 ± 13	3 ± 0,4	3 ± 0,4	187 ± 9	180 ± 8	157 ± 9	166 ± 10
19	154 ± 15	150 ± 14	238 ± 15	198 ± 13	4 ± 0,2	3 ± 0,3	190 ± 10	171 ± 8	152 ± 9	173 ± 10
20	140 ± 11	136 ± 11	250 ± 17	219 ± 15	3 ± 0,4	3 ± 0,3	177 ± 7	167 ± 9	160 ± 10	170 ± 9
21	160 ± 13	145 ± 12	237 ± 14	208 ± 15	3 ± 0,4	3 ± 0,4	170 ± 9	162 ± 9	159 ± 8	169 ± 11
22	142 ± 13	154 ± 14	240 ± 14	200 ± 13	3 ± 0,4	3 ± 0,4	182 ± 10	178 ± 8	155 ± 8	162 ± 10
	149 ± 13*	145 ± 13	242 ± 15	207 ± 14	3 ± 0,4	3 ± 0,4	181 ± 9	172 ± 8	157 ± 9	168 ± 10

K = Kontrolle
A = Aureomycinzulage (10 mg/kg Futter)
* = jeder Wert als Mittel von 30 Tieren

Tabelle 2: Enzymaktivitäten in der Leber keimfrei gehaltener Küken (Futter Nr. 2)
(jeder Wert als Mittel von 6 Tieren)

Untersuchung nach Lebenstagen	Bernsteinsäure-dehydrogenase		Butyryldehydrogenase		L-Aminosäure-oxydase		NAD-H-Cytochrom-c-Reduktase		Cytochrom-c-Oxydation	
	gemessen in n Mol TTC/mg Protein/Stunde						gemessen in n Mol Cytochrom c reduziert		gemessen in n Mol Cytochrom c oxydiert	
	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A
18	117 ± 14	115 ± 14	179 ± 15	167 ± 14	4 ± 0,4	4 ± 0,5	180 ± 9	175 ± 8	162 ± 9	175 ± 10
19	131 ± 12	108 ± 13	165 ± 13	170 ± 14	4 ± 0,5	4 ± 0,5	189 ± 10	171 ± 9	167 ± 8	179 ± 11
20	129 ± 13	121 ± 13	187 ± 15	155 ± 13	4 ± 0,3	4 ± 0,3	173 ± 9	160 ± 9	170 ± 9	186 ± 9
	126 ± 13*	115 ± 13	177 ± 14	164 ± 14	4 ± 0,4	4 ± 0,4	181 ± 9	169 ± 9	166 ± 9	180 ± 10
	Die beiden unteren Einheiten waren seit dem Schlupf mit Streptococcus faecalis infiziert. Statt der Butyryl- wurde die Capryldehydrogenaseaktivität bestimmt.									
21	113 ± 12	119 ± 13	29 ± 4	25 ± 4	4 ± 0,5	4 ± 0,3	190 ± 9	172 ± 9	166 ± 9	177 ± 10
22	126 ± 12	112 ± 14	27 ± 5	22 ± 6	4 ± 0,4	4 ± 0,6	178 ± 9	170 ± 9	170 ± 9	185 ± 11
	120 ± 12**	116 ± 14	28 ± 5	24 ± 5	4 ± 0,5	4 ± 0,5	184 ± 9	171 ± 9	168 ± 9	181 ± 11

* = jeder Wert als Durchschnitt von 18 Tieren
** = jeder Wert als Durchschnitt von 12 Tieren

K = Kontrolle
A = Aureomycinzulage (10 mg/kg Futter)

geprägter ist. Die Reduktase wurde praktisch nicht beeinflußt. Die Aktivität der L-Aminosäureoxydase bewegte sich immer an der Bestimmungsgrenze, so daß diese Werte nicht in die Diskussion einbezogen werden können.

Alle Ergebnisse zeigen deutlich, daß die keimfreien Tiere schon ohne Aureomycinzufütterung eine stärker anabole Stoffwechsellage (gehemmte Flavinenzyme und gesteigerte Cytochrom-c-Oxydation: vgl. S. 7) aufweisen, als wir sie bei Konventionaltieren durch die Aureomycinzufütterung erreichen können. Dieses Ergebnis spricht für die Richtigkeit der vorgesehenen Versuchsanstellung (vgl. S. 8).

An zweiter Stelle wurde versucht, sterilisierte katabole Hormone (Thyroxin, NNR-Hormone) als Stressoren einzusetzen, um die Wachstumstendenz der Steriltiere - dem Versuchsplan entsprechend - zu vermindern. Zuerst wurde reines L-Thyroxin in einer Menge von 250 mcg/Tier einmalig i.m. verabreicht und Wachstum und Enzymaktivitäten ein, zwei und drei Tage nach der Hormongabe bestimmt. Um Erfahrungen zu sammeln, wurden für diesen Versuch zunächst nur konventionelle Tiere herangezogen. Aureomycin wurde noch nicht zugegeben. Tabelle 3 (S. 24) zeigt die Stoffwechselbeeinflussung durch das Schilddrüsenhormon in idealer Weise: starke Beschleunigung der Cytochrom-c-Oxydation, Erhöhung der Bernsteinsäuredehydrogenase (als Zeichen einer erhöhten ACTH-Ausschüttung), Senkung der Butyryldehydrogenase (durch Mehrausschüttung anaboler Faktoren (STH, Insulin) zu deuten, von der die Butyryldehydrogenase nach der L-Aminosäureoxydase zuerst erfaßt wird) und starke Wachstumsdepression. Am 2. Tag beginnende Normalisierung der veränderten Enzymaktivitäten (Ausnahme Butyryldehydrogenase!) mit beginnender Gewichtszunahme und am 3. Tag Normalbedingungen, auch in der Wachstumstendenz, wiederum mit Ausnahme der Butyryldehydrogenase, die als Zeichen einer verstärkten Ausschüttung von anabolen Hormonen weiter absinkt. Die L-Aminosäureoxydase wurde hier ebenso wie in den folgenden Versuchen nicht mitbestimmt, weil keine Ausschläge zu erwarten waren. Spätere Versuche mit verbesserter Methodik (113) zeigen, daß sich dieses Enzym - wie theoretisch gefordert werden muß (vgl. S. 7) - entsprechend der Butyryldehydrogenase verändert, allerdings mit wesentlich größeren Ausschlägen.

Um das Hormon den keimfreien Tieren, die für den folgenden Versuch herangezogen wurden, in möglichst einfacher Weise zuführen zu können, wurde es in steigenden Mengen von 1 - 10 mg/kg dem Futter beigemischt. Wie aus Tabelle 4 (S. 25) hervorgeht, hatte eine Aureomycinzulage von

Tabelle 3: Enzymaktivitäten in der Leber konventionell gehaltener Küken (Futter Nr. 1) zu verschiedenen Zeiten nach Thyroxinbelastung (250 mcg/Tier i.m.) (jeder Wert als Durchschnitt von 6 Tieren)

Zeit nach der Thyroxingabe (Stunden)	Gewichtszunahme 24 Std. vor der Tötung	Bernsteinsäure-dehydrogenase	Butyryldehydro-genase	Cytochrom-c-Oxydation
		gemessen in n Mol TTC/mg Protein/Stunde		gemessen in n Mol Cyt. c/mg Protein/ 120 sec.
0	+ 16,1 g ± 1	253 ± 15	324 ± 15	168 ± 10
24	- 1,3 g ± 1	464 ± 20	255 ± 19	310 ± 16
48	+ 7,8 g ± 1	400 ± 18	247 ± 18	242 ± 14
72	+ 16,5 g ± 1	269 ± 15	105 ± 13	157 ± 12

Tabelle 4: Enzymaktivitäten in der Leber keimfrei gehaltener Küken (Futter Nr. 2) nach oraler Thyroxinbelastung
(jeder Wert als Mittel von 6 Tieren)

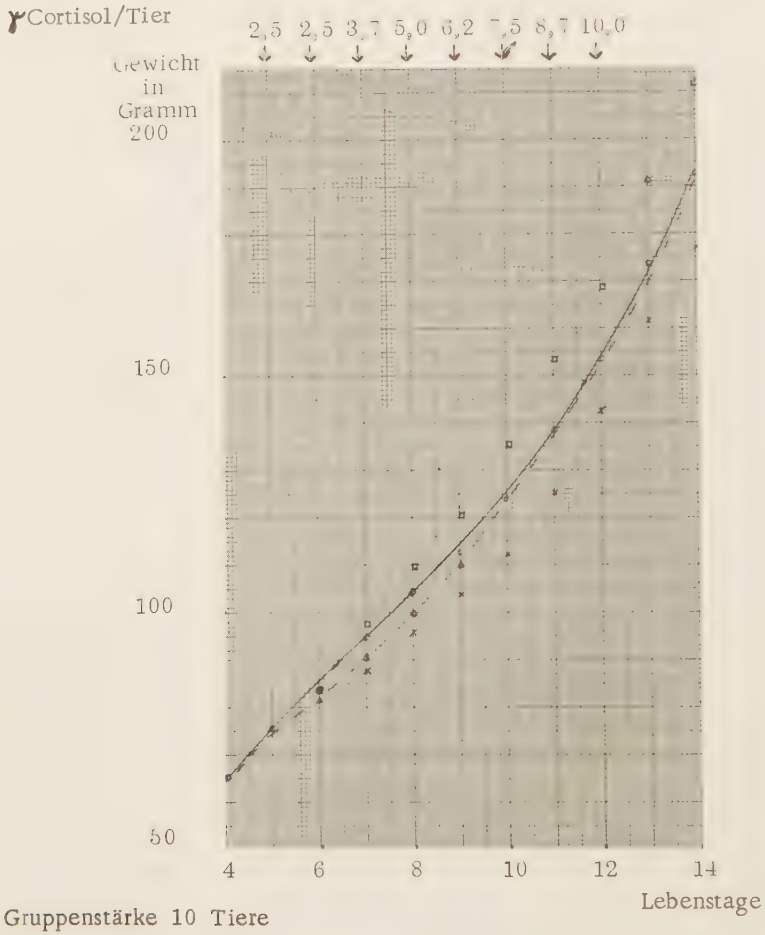
Behandlung	Versuchszeit Tage	Ø tägl. Gewichtszunahme während d. Versuchszeit in g		Bernsteinsäure-dehydrogenase		Butyryldehydrogenase		NAD-H-Cytochrom-c-Reduktase		Cytochrom-c-Oxydation	
				gemessen in n Mol TTC/mg Protein/Stunde				gemessen in n Mol Cytochrom c reduziert		oxydiert	
		K	A	K	A	K	A	K	A	K	A
unbehandelt	22	19	18	91 ± 12	120 ± 14	85 ± 12	85 ± 13	137 ± 13	191 ± 10	145 ± 12	173 ± 12
je 4 Tage 1 mg, 5 mg und 10 mg L-Thyroxin/ kg Futter	22	28	24	116 ± 13	146 ± 15	62 ± 12	128 ± 14	93 ± 12	116 ± 12	200 ± 13	164 ± 14
3 Tage 5 mg L-Thyroxin/ kg Futter*	24	+ 2	- 11	158 ± 13	138 ± 14	163 ± 14	148 ± 14	84 ± 13	84 ± 12	229 ± 13	267 ± 14

* Diese Gruppe war seit dem Schlupf mit Streptococcus faecalis infiziert.

K = Kontrolle
A = Aureomycinzulage (10 mg/kg Futter)

Abbildung 6

Wachstum von konventionell gehaltenen Küken (Futter Nr. 1) bei Hormon- bzw. Hormon- und Chlortetracyclinverabreichung



Gruppenstärke 10 Tiere

—△—△— Kontrolle

----×----× +62,5γ Thyroxin + Cortisol (s.o.) täglich

—○—○— " " + 10 mg CTC/kg Futter

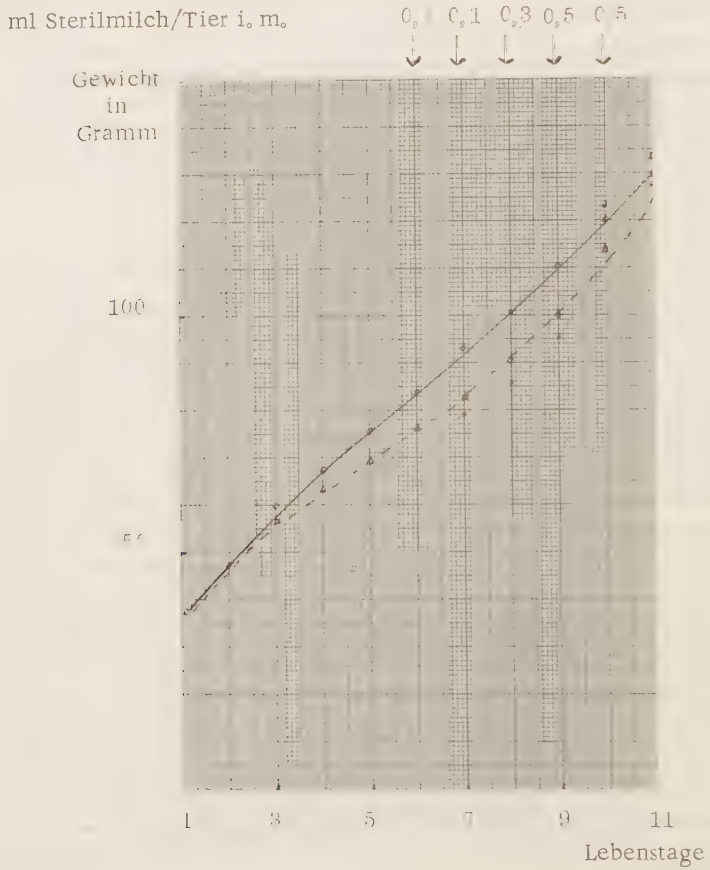
—□—·—□ " " + 250 mg CTC/kg Futter

tional- und Sterilküken eine primäre Wachstumsdepression bis zu 40 % erzielen, die sich mit der Zeit normalisiert, bei Konventionaltieren schon nach 4tägiger, bei Steriltieren nach etwa 10tägiger Zuführung Abb. 7 und 8, S. 28 und 29). Durch die Milchinjektion schien demnach die milde Stress-Situation hervorgerufen zu werden, die zwar nur über einen begrenzten Zeitraum aufrecht zu erhalten ist, die aber ausreicht, um einen eventuellen Antibiotikumeffekt zu erfassen. Wie die Abbildung 8 (S. 29) zeigt, tritt tatsächlich kein "Milcheffekt" ein, wenn dem Futter 10 mg/kg Aureomycin zugemischt wurden. Dieses Ergebnis wurde dreimal an insgesamt 56 Tieren reproduziert - einer für Sterilversuche außerordentlich großen Zahl - und darf daher als gesichert angesehen werden.

Die Tabellen 5 und 6 (S. 30 und 31) geben wenigstens teilweise darüber Auskunft, wodurch die Wachstumsdepression nach der Milchinjektion bedingt ist. Die Schilddrüsenfunktion steigt schon 1 Stunde nach der Milchinjektion signifikant an und nähert sich dann langsam dem Normzustand (Konventionaltiere, Tab. 5). 6 Tage nach der einmaligen Injektion ist eher eine subnormale Aktivität festzustellen. Andererseits ist keine Beschleunigung der Cytochrom-c-Oxydation nachweisbar, wenn das Futter Aureomycin enthält. Parallel dazu tritt keine Wachstumsdepression ein. Leider konnten aus versuchstechnischen Gründen die Butyryldehydrogenase und die L-Aminosäureoxydase nicht miterfaßt werden. Für die L-Aminosäureoxydase ist mit großer Wahrscheinlichkeit 1 Stunde nach der Milchinjektion eine Stimulierung zu erwarten. Diese Versuche sollen zu gegebener Zeit nachgeholt werden. Die Aktivität der NAD-H-Cytochrom-c-Reduktase nimmt nur bei den Steriltieren charakteristisch zu; allerdings ist auch bei den Konventionaltieren 6 Tage nach der Milchapplikation - in Angleichung an den keimfreien Zustand! - eine Aktivitätsminderung dieses Enzyms nachweisbar. Die beim keimfreien Tier erkennbare Aktivitätszunahme ist als Erhöhung der NNR-Funktion - im Sinne der Stress-Situation - zu deuten. Die Wachstumsdepression ist entsprechend bei diesen Tieren stärker und nachhaltiger.

Abbildung 7

Wachstum von konventionell gehaltenen Küken (Futter Nr. 2) bei Sterilmilch- bzw. Sterilmilch- + Chlortetracyclinverabreichung



Gruppenstärke 10 Tiere

—△—△— Kontrolle

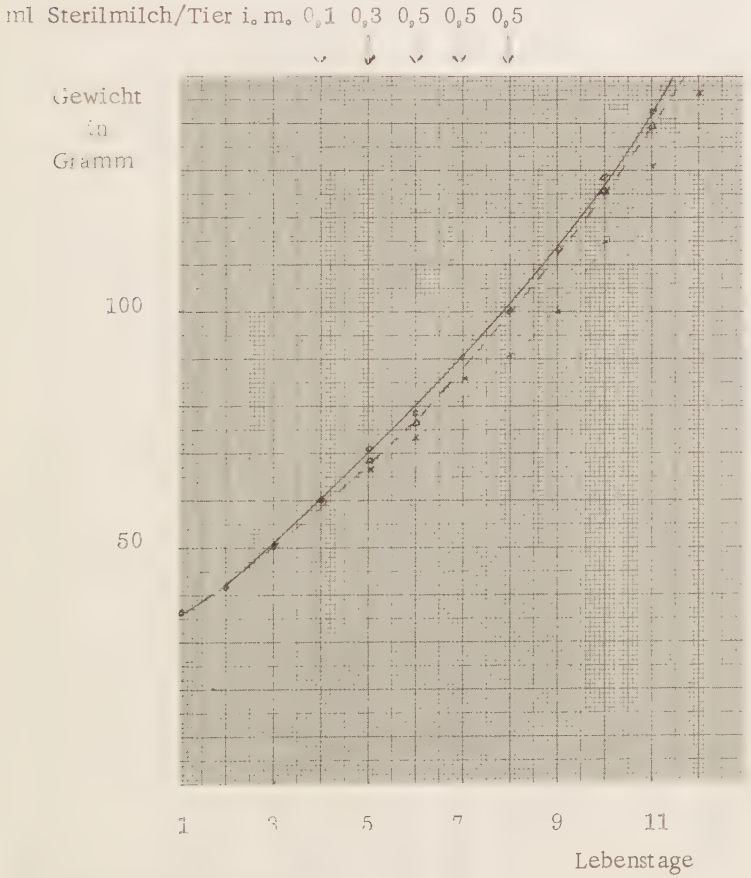
---×---×-- + Sterilmilch i.m.

——○——○— + 10 mg CTC/kg Futter

—□—·—□ + Sterilmilch i.m. + 10 mg CTC/kg Futter

Abbildung 8

Wachstum von keimfrei gehaltenen Küken (Futter Nr. 2) bei Sterilmilch- bzw. Sterilmilch- + Chlortetracyclinverabreichung



Gruppenstärke 20 Tiere

— —△— —△— Kontrolle

---×---×---× + Sterilmilch i.m.

—o—o—o + 10 mg CTC/kg Futter

—□—□— □ + Sterilmilch i.m. + 10 mg CTC/kg Futter

Tabelle 5: Enzymaktivitäten in der Leber konventioneller Küken (Futter Nr. 2)
(Leberhomogenat; jeder Wert als Mittel aus 6 Tieren)

Zeit nach Antigen-verabreichung (Stunden)	Antigen	NAD-H-Cytochrom-c-Reduktase gemessen in n Mol Cytochrom c reduziert pro mg Protein/120 Sekunden		Cytochrom-c-Oxydation gemessen in n Mol Cytochrom c oxydiert pro mg Protein/120 Sekunden	
		K	A	K	A
-	keimfrei unbehandelt	127 ± 9	150 ± 9	79 ± 8	91 ± 10
-	konventionell unbehandelt	156 ± 9	170 ± 8	75 ± 8	86 ± 10
1	konventionell Sterilmilch 1 ml i.m.	148 ± 10	166 ± 10	107 ± 10	89 ± 11
4	konventionell Sterilmilch 1 ml i.m.	150 ± 12	-	99 ± 13	-
8	konventionell Sterilmilch 1 ml i.m.	161 ± 12	-	90 ± 12	-
144	konventionell Sterilmilch 1 ml i.m.	126 ± 10	113 ± 9	63 ± 11	65 ± 9
24	konventionell S. pullorum 0,5 ml i.m.	218 ± 11	-	107 ± 13	-

K = Kontrollversuch

A = Aureomycinzulage (10 mg/kg Futter)

Tabelle 6: Enzymaktivitäten in der Leber keimfrei gehaltener Küken (Futter Nr. 2)

Versuchszeit (Tage)	Zeit nach der Antigenverabreichung (Stunden)	Antigen	Tierzahl	NAD-H-Cytochrom-c-Reduktase gemessen in n Mol Cytochrom c reduziert pro mg Protein/120 Sekunden		Cytochrom-c-Oxydation oxydiert pro mg Protein/120 Sekunden	
				K	A	K	A
15	-	unbehandelt	3/Gruppe	135 ± 9	142 ± 9	75 ± 8	106 ± 10
15	1	0,5 ml Sterilmilch i.m.	10/Gruppe	166 ± 11	150 ± 10	136 ± 12	101 ± 10

K = Kontrollversuch
A = Aureomycinzulage (10 mg/kg Futter)

DISKUSSION

Alle Bemühungen, mit Hilfe von katabolen Hormonen (Thyroxin-NNR-Hormon) bei den Steriltieren eine durch Aureomycin kompensierbare Wachstumsdepression zu erzielen, führten zwar nicht zu dem gewünschten Ergebnis, brachten aber eine weitere Bestätigung dafür, daß die von SCHOLE (5) postulierten Punkte des Energiestoffwechsels (Flavinenzyme und Cytochrom-c-Oxydation) tatsächlich hormonal reguliert werden und daß die beobachteten Aktivitätsänderungen mit der Wachstumsgeschwindigkeit in Zusammenhang zu bringen sind.

Andererseits können wir feststellen, daß eine Wachstumsdepression, die bei Sterilküken durch tägliche Injektionen von Sterilmilch erreicht werden kann, mit einer Beschleunigung der Cytochrom-c-Oxydation (als Zeichen einer gesteigerten Schilddrüsenfunktion) und einer erhöhten NAD-H-Cytochrom-c-Reduktase-Aktivität (als Zeichen einer gesteigerten NNR-Funktion (vgl. S. 7)) verknüpft ist. Durch gleichzeitige Aureomycinfütterung in der für die Hähnchenmast üblichen Menge von 10 mg/kg Futter wird diese Verminderung der Wachstumsgeschwindigkeit und gleichzeitig die Intensivierung der über die Enzymaktivitäten gemessenen Drüsenfunktionen verhindert. Da unter kontrolliert sterilen Bedingungen gearbeitet worden ist, dürfte dieses Ergebnis als ein erster Beweis für die Stoffwechselwirkung der Antibiotika aufzufassen sein.

Jetzt wäre die Frage zu stellen, wie man sich den Stoffwechseleffekt des Antibiotikums vorzustellen hat. Offensichtlich kann das Aureomycin die Rolle eines "Stress-Dämpfers" übernehmen. Wenn man von dem Gedanken ausgeht, daß die Aktivitäten der Flavinenzyme parallel mit der Stress-Situation ansteigen, was am deutlichsten bei einem Vergleich zwischen konventionellen und keimfreien Küken zum Ausdruck kommt (Tab. 1 und 2, S. 21 und 22), so wird der Stressdämpfer-Effekt verständlich, da man das Antibiotikum als Flavinenzymhemmstoff betrachten kann (5).

Bedenkt man aber, daß die leicht katabole Stoffwechselsituation des Konventionaltieres vom Organismus geschaffen wird, um die schädlichen Insulte, die zu dieser Situation geführt haben, besser neutralisieren zu können, dann ist man zunächst überrascht, daß trotz der durch Aureomycin anabol verschobenen Stoffwechsellage die Stressbeantwortung (Entgiftung etc.)

nicht nur nicht leidet, sondern offensichtlich noch günstiger gestaltet wird.

Eine Erklärung wäre möglich, wenn man die Spezifität der Hormonwirkungen in Rechnung stellt. Das STH wirkt spezifisch auf das Mesenchym, die NNR-Hormone auch, sekundär aber in größerem Umfang als das STH im Gesamtorganismus. Das ergibt sich schon daraus, daß als weiterer anaboler Faktor das Insulin eingesetzt wird, für das von der Seite der NNR keine spezifische Verbindung entgegengesetzt werden kann. Durch eine unspezifische Belastung dürfte nun die Regulation primär so gelenkt werden, daß im Mesenchym eine für die Abwehrfunktion optimale Reaktionslage hergestellt wird, unabhängig davon, ob andere, für diese Aufgabe weniger wichtige Organe eine leicht katabole Stoffwechsellage erhalten. Diese kann dann ohne Änderung der mesenchymalen Verhältnisse durch eine zusätzliche anabole Substanz verbessert werden.

Zum zweiten scheint sich der Organismus hinsichtlich der Einstellung der Reaktionslage meistens an der Grenze der biologischen Notwendigkeit zu bewegen Diese Tatsache wird durch die sogenannte "unspezifische Reiztherapie" ausgenutzt, z. B. bei einer Belastung, die unter der Reizschwelle für ein akutes Anlaufenlassen von Regulationsvorgängen liegt, die zu maximaler Abwehrbereitschaft führen könnten. Durch einen zusätzlichen unspezifischen Stress wird diese Reizschwelle überschritten und damit gleichzeitig die unterschwellige spezifische Belastung ausgeräumt. Entsprechend kann man sich den zweiten Teil der Antibiotikumwirkung zusätzlichen als Stress denken, der die regulative Reizschwelle überwindet und zu vermehrter Ausschüttung von Hypophysenhormon - und damit auch Wachstumshormon - führt, die jetzt die Reaktionslage des Mesenchyms optimal einregulieren. Das Ergebnis der Antibiotikumwirkung auf den Stoffwechsel würde demnach in der Kombination eines organunspezifischen anabolen Effektes und einer Art Reiztherapie bestehen, mit dem Erfolg eines verbesserten Wachstums und einer gesteigerten Abwehrbereitschaft gegenüber Belastungen, die von außen herantreten.

Nach diesen Überlegungen ist es auch zu erwarten, daß bei schon vorliegender optimaler Reaktionslage (Steriltier) der "Stressor" Antibiotikum nicht oder nur noch katabol - im Sinne einer Verschlechterung der Stoffwechsellage - wirksam wird, was entsprechend der Abbildung 5 (S. 20) der Erfahrung entspricht.

Wichtig und weiterer Untersuchungen wert erscheint der Befund über die pendelnden Aktivitäten der Cytochrom-c-Oxydation und der Reduktase in den ersten Lebenstagen. Da der 10. Lebenstag etwa mit dem Zeitpunkt zusammenfällt, an dem der Dottersack eingeschmolzen und das Tier endgültig hinsichtlich Ernährung und Abwehrbereitschaft (Antikörperbildung?) auf sich selbst gestellt ist, dürfte der Befund von Interesse sein, daß diese für das Küken kritische Lebensperiode mit einer entsprechenden Änderung von Drüsenfunktionen einhergeht. Denn die Veränderungen der Cytochrom-c-Oxydation lassen sich nach den auf Seite 7 skizzierten Erfahrungen als Änderungen der Schilddrüsenfunktion, der Gang der Reduktaseaktivität als Gang der NNR-Funktion diskutieren. Am 10. Lebenstag findet man demnach gerade eine optimale Thyroxinkonzentration und noch einen geringen NNR-Hormonspiegel, also eine für Wachstum und Antikörperproduktion optimale Reaktionslage.

ZUSAMMENFASSUNG

Ausgehend von der Tatsache, daß sterile Küken um 10 - 20 % besser wachsen als konventionell gehaltene Tiere, wurde die Meinung vertreten, daß eine Wachstumsbeschleunigung der keimfreien Tiere durch Antibiotika nur dann erzielt werden kann, wenn die Wachstumsgeschwindigkeit derselben durch Zuführung steriler Stressfaktoren derjenigen von Konventionaltieren angeglichen wird.

Versuche, eine durch Aureomycin kompensierbare wachstumsdepressive Belastung mit Hilfe von Hormonen (Thyroxin, Nebennierenrindenhormon) zu erreichen, führten nicht zum Erfolg. Nur bei Konventionaltieren konnte eine kombinierte tägliche Belastung mit 62,5 mcg L-Thyroxin und steigend 2,5 - 10 mcg Cortisol durch eine Aureomycinzulage von 10 mg/kg Futter voll kompensiert werden. Bei gleichzeitiger Verabreichung von 250 mg Aureomycin kg Futter wurde die Wachstumsgeschwindigkeit trotz der Hormongaben gegenüber unbelasteten Kontrolltieren erheblich gesteigert.

Die intramuskuläre Injektion eines sterilen Antigens (Sterilmilch in steigenden Mengen von 0,1 - 0,5 ml/Tier und Tag über 6 Tage) drückt dagegen die Gewichtszunahmen sowohl von keimfreien als auch von konventionell gehaltenen Tieren im Alter von 3 - 10 Tagen bis zu 40%. Die gleichzeitige Verabreichung von 10 mg Aureomycin/kg Futter verhindert das Auftreten dieser Entwicklungsstörung durch das sterile Antigen unter beiden Haltungsbedingungen. Diese Wirkung des Antibiotikums ist demnach völlig unabhängig von einer mikrobiellen Besiedlung und daher jenseits der Darmwand zu suchen.

Parallel zu den Wachszumsversuchen wurden die Aktivitäten der Flavinenzyme (Bernsteinsäure- und Butyryldehydrogenase, NAD-H-Cytochrom-c-Reduktase) und die Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation gemessen. Bei keimfreien Küken wurden - entsprechend der stärker anabolen Stoffwechsellage - wesentlich tiefere Flavinenzymaktivitäten und eine geringgradig höhere Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation als bei konventionellen Tieren ermittelt. Die Belastung mit Sterilmilch (0,5 ml/Tier) führte bei Tieren unter beiden Haltungsbedingungen innerhalb 1 Stunde zu einem Ansteigen der Cytochrom-c-Oxydation, während sich die NAD-H-Cytochrom-c-Reduktase nur bei den keimfreien Tieren signifikant erhöhte. Diese Veränderun-

gen gingen mit den Änderungen der Wachstumsgeschwindigkeit parallel. Durch die Aureomycinzulage wurden die Wachstumsdepression und die Aktivitätsänderung der Enzyme aufgehoben. Die Reizbeantwortung ist also in allen Fällen bei Tieren mit und ohne mikrobieller Besiedlung gleich.

Es wird diskutiert, daß die Stoffwechselwirkung des Antibiotikums einerseits durch einen direkten anabolen Effekt ("Stress-Dämpfung"), andererseits durch einen hiermit in direktem Zusammenhang stehenden Reiz zustande kommt, der über die Mobilisierung von Hypophysenhormonen zu einer allgemeinen Resistenzsteigerung führt.

SUMMARY

Proceeding from the fact that sterile chicks grow 10 to 20% better than conventionally raised fowls, the opinion was advanced that increase in the rate of growth of sterile fowls by means of antibiotics can only then be achieved if the rate of growth of the same is assimilated to that of conventionally raised fowls through the addition of sterile stress factors.

Tests to achieve growth depressive stress compensable through aureomycin with the aid of hormones (thyroxin, adrenal hormone) were not successful. It was only possible with conventional fowls to fully compensate a combined daily stress with 62,5 mcg L-thyroxin and cortisol fed in increased quantities of 2,5 - 10 mcg through the addition of 10 mc aureomycin/kg of feed. Simultaneous feeding of 250 mg aureomycin/kg of feed resulted in considerably increased growth rate comared with conventional test fowls in spite of the hormone doses.

Intramuscular injection of a sterile antigen (sterile milk in increasing quantities of 0,1 - 0,5 ml/fowl and day over a period of 6 days) on the other hand retards weight increase by as much as 40% in sterile fowls as well as conventionally raised fowls of ages ranging from 3 to 10 days. In both categories the simultaneous addition of 1ß mg aureomycin/kg of feed prevents the occurrence of this retardation in development caused by the sterile antigen. This effect of the antibioticum is therefore completely independent of microbic invasion and must therefore be sought outside the intestinal wall.

The Activities of the flavin enzymes (succinic acid and butyryldehydrogenase, NAD-H cytochrome c-reductase) and the rate of cytochrome c-oxydation were measured parallel with the growth-test activities. In the case of sterile chicks (proportionate to the stronger anabolic metabolism process) considerably lesser flavin enzyme activity and an insignificantly higher rate of cytochrome c-oxydation were determined than in the case of conventional fowls. Stress with sterile milk (0,5 ml/fowl) led to an increase in cytochrome c-oxydation within 1 hour in fowls of both categories, whereas the NAD-H cytochrome c-reductase rose only in the sterile fowls. These changes developed parallel with the changes in growth rate. The addition of aureomycin resulted in compensation of growth

depression and change in enzyme activity. Reaction to irritation is therefore the same in all cases in fowls with and without microbic invasion.

It is argued that the metabolic effect of the antibioticum is brought about on the one hand by means of a direct anabolic effect (stress damping) and on the other hand by an irritant in direct connection herewith which brings about a generally increased resistance through mobilization of hypophyseal hormones.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Stokstad, E.L.R., T.H. Jukes, J.V. Pierce, A.C. Page Jr., A. L. Franklin
J. biol. Chem. 180, 647 (1949)

2. Stokstad, E.L.R., T.H. Jukes
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 523 (1950)

3. Merkenschlager, M., U. Lösch, G. Riedel
Tierärztl. Umschau 3, 132 (1967)

4. Merkenschlager, M., J. Schole, G. Riedel, H. Schmidt
21. Tagung d. Ges. f. Ernährungsphysiologie d. Haustiere
Gießen 1967

5. Schole, J.
Zentralbl. f. Vet.med., Beiheft 5 (1966)

6. Symposion über das Hypophysenwachstumshormon
Detroit 1954, z. B. Bartlett, Engel, Reid, Russel et al.

7. Carpenter, L.E.
Iowa Vet. 2215 (1951)

8. Catron, D.V., H.M. Maddock, V.C. Speer, R.L. Vohs
Antibiotics Chemoth. I. 31 (1954)

9. Waibel, P.E., O.J. Abbott, C.A. Baumann, H.R. Bird
Poultry Sci. 33, 1141 (1954)

10. Pritchard, G.J., W.H. Riddell, W.B. Durrel
J. Anim. Sci. 14, 1011 (1955)

11. Bowland, J.P.
The Press Bull., Univ. of Alberta 41/2/12 (56)

12. Scott, L.M.
Europäisch. Symp. Oslo (1961)

13. Frølich, A.
Europäisch. Symp. Oslo (1961)

14. Romoser, G.L., M.S. Shorb, G.F. Combs, M.J. Pelczar
Antibiotics Chemoth. II. 42 (1952)

15. Anderson, G.W., J.D. Cunningham, S.J. Slinger
J. Nutr. 48, 539 (1952)

16. Anderson, G.W., J.D. Cunningham, S.J. Slinger
J. Nutr. 47, 175 (1952)

17. Guzman-Garcia, I., W.B. Sarles, C.A. Baumann
J. Nutr. 49, 647 (1953)

18. Romoser, G.L., M.S. Shorb, G.F. Combs
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 83, 17 (1953)

19. Eisenstark, A., P.E. Sanford
Poultry Sci. 32, 837 (1953)

20. Slinger, S.J., M.M. Hauser, W.F. Pepper
Poultry Sci. 32, 925 (1953)

21. Chance, C.M., C.K. Smith, C.F. Huffman, C.W. Duncan
J. Dairy Sci. 36, 743 (1953)

22. Schendel, H.E., H.F. Borg, B.C. Johnson
J. Anim. Sci. 13, 904 (1954)

23. Rhodes, R.A., W.B. Sarles, W.J. Mondson, A.E. Harper, C.A. Elvehjem
J. Nutr. 53, 289 (1954)

24. Cook, F.D., R.M. Blakely, H.J. McGregor, R.W. Anderson
Poultry Sci. 33, 38 (1954)

25. Hauser, M.M., G.W. Anderson, W.F. Pepper, S.J. Slinger
Poultry Sci. 33, 1058 (1954)

26. Richter-Otto, W.
Arch. Tierern. 5, 257 (1955)

27. Larson, N.L., E.G. Hill
J. Anim. Sci. 14, 674 (1955)

28. Szilvinyi, A., H. Leithenmayer
Mitl. Versuchsstation Gärungsgewerbe (Wien) 9/91 (1955)
und 9/125 (1955)

29. Hauser, M.M., G.W. Anderson, W.F. Pepper, S.J. Slinger
Poultry Sci 35, 27 (1956)

30. Wiseman, R.F., W.B. Sarles, D.A. Benton, A.E. Harper,
C.A. Elvehjem
J. Bacteriol. 72, 723 (1956)

31. Price, K.E., Z. Zolli, W.P. Hardic, M.J. Gallian
Poultry Sci. 36, 219 (1957)

32. Jahn, F.
Inauguraldissertation, Tierärztl. Hochschule Wien 1958

33. Cook, F.D., R.M. Balkely, H.J. McGregor, R.W. Anderson
Poultry Sci. 31, 912 (1952)

34. Scaletti, J.V., W.L. Kulp, R.G. Cleverdon
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 83, 599 (1953)

35. Sieburth, J.M., J.J. Jezeski, E.G. Hill, L.E. Carpenter
Poultry Sci. 33, 753 (1954)

36. Rhodes, R.A., W.B. Sarles, W.J. Monson, A.E. Harper,
C.A. Elvehjem
J. Nutr. 43, 289 (1954)

37. Raibaud, P.
Ann. Nutr. Aliment. 12, 135 (1958)

38. Lih, H., C.A. Baumann
J. Nutr. 43, 565 (1951)

39. Coates, M.E., C.D. Dickinson, G.F. Harrison, S.K. Kon
Biochem. J. 49, 18 (1951)

40. Biely, J., B.E. March
Science 114, 330 (1951)

41. Linkswiler, H.M., C.A. Baumann, E.E. Snell
J. Nutr. 43, 565 (1951)

42. Bauberlich, H.E.
J. Nutr. 46, 99 (1952)

43. Waibel, P.E., W.W. Gravens, C.A. Baumann
J. Nutr. 50, 441 (1953)

44. Calet, C., A. Rerat, R. Jaquet
Compt.rend.Acad.Sci. France 236, 2340 (1953)

45. Chow, B.F., R.L. Davies, S. Davies
J. Nutr. 49, 657 (1953)

46. Catron, D.V., R.W. Bennison, H.M. Madock, G.C. Ashton, P.G. Homeyer
J. Anim. Sci. 12, 51 (1953)

47. Schendel, H.E., B.C. Johnson
J. Nutr. 54, 461 (1954)

48. Slinger, S.J., W.F. Pepper
Poultry Sci. 33, 633 (1954)

49. Halevy, S., E.J. Diamant, K. Guggenheim
Brit. J. Nutr. 9, 57 (1955)

50. Coates, M.E., M.K. Davies, S.K. Kon
Brit. J. Nutr. 9, 110 (1955)

51. Vogel, G.R., S.M. Hange, F.N. Andrews
J. Nutr. 65, 525 (1958)

52. Terri, A.E., P.M. Gannis, R.C. Ringrose
Poultry Sci. 38, 360 (1959)

53. Beller, K.
Arch. Tierern., Sonderheft 5, 216 (1954)

54. Elam, J.F., R.L. Jakobs, J. Fowler, F. Hale, J.R. Couch
J. Anim. Sci. 12, 819 (1953)

55. Lev, M., C.A.E. Briggs, M.E. Coates
Nature 178, 1125 (1956)

56. Lev, M., C.A.E. Briggs, M.E. Coates
Brit. J. Nutr. 11, 364 (1957)

57. Lev, M., M. Frobes
Brit. J. Nutr. 13, 78 (1959)

58. Haenel, H., E. Gerriets, W. Müller-Beuthow, B. Gassmann
Arch. Geflügelkde. 24, 217 (1960)

59. Coates, M.E.
Europäisch. Symp. Oslo (1961)

60. Dixon, J., R.H. Thayer
Poultry Sci. 30, 910 (1951)

61. Anderson, G.W., S.J. Slinger, W.F. Pepper
Poultry Sci. 31, 905 (1952)

62. Elam, J.F., R.L. Jacobs, J. Fowler, J.R. Couch
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85, 645 (1954)

63. Slinger, S.J., M.M. Hauser, W.F. Pepper
J.Nutr. 52, 75 (1954)

64. Eyssen, H., V. De Prins, P. De Sommer
Poultry Sci. 41, 227 (1962)

65. Merkenschlager, M.
Europäisch. Symp. Oslo (1961) und persönliche Mitteilung

66. Jukes, T.H., W.L. Williams, E.L.R. Stokstad, S.C. Wong, H.R. Cox
Papers presented at the Informal Poultry Nutrition Conference, New York 1952

67. Reyniers, J.A., P.C. Trexler, R.F. Ervin, M. Wagner, T.D. Luckey, H.A. Gordon
Lobund Rep. Nr. 2, Univ. of Notre Dame, India 1949

68. Williams, W.L., R.R. Taylor, E.L.R. Stokstad, T.H. Jukes
Fed. Proc. 10, 270 (1951)

69. Gordon, H.A.
Lobund Institute, Univ. of Notre Dame, India (1952)

70. Jukes, T.H., W.L. Williams, E.L.R. Stokstad, S.C. Wong, H.R. Cox
Paper presented at the Informal Poultry Nutrition Conference, Federation Meetings, New York 1952

71. Jukes, T.H., W.L. Williams
Pharmacol. Rev. 5, 381 (1953)

72. Gordon, H.A., M. Wagner, B.S. Wostmann
Antibiotics Annual 248 (1957/58)

73. Luckey, T.D., Antibiotics in Agriculture publication
First Intern. Conference 397/135 (1956)

74. Luckey, T.D., H.A. Gordon, M. Wagner, J.A. Reyniers
Antibiotics and Chemotherapy 6, 36 (1956)

75. Wostmann, B.S., P.L. Knight, J.A. Reyniers
J. Nutr. 66, 577 (1958)

76. Forbes, M., W.C. Supplee, G.F. Combs
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 99, 110 (1958)

77. Forbes, M., J.T. Park
J. Nutr. 67, 69 (1959)

78. Lev, M., M. Forbes
Brit. J. Nutr. 13, 78 (1959)

79. Braham, J.E., H.R. Bird, C.A. Baumann
J. Nutr. 67, 149 (1959)

80. Coates, M.E., R. Fuller, G.F. Harrison, U. Lev, S.F. Suffolk
Brit. J. Nutr. 17, 141 (1963)

81. Migicovsky, B.B., A.M. Nilson, M. Gluck, R.C. Burgess
Arch. Biochem. 34, 479 (1951)

82. Ross, E., H. Yakowitz
Poultry Sci. 33, 262 (1954)

83. Lindblad, G.S., S.J. Slinger, J. Motzok
Poultry Sci. 33, 482 (1954)

84. Bogdonoff Jr., P.O., C.S. Schaffner
Poultry Sci. 33, 7 (1954)

85. Gabuten, A.R., C.S. Schaffner
Poultry Sci. 33, 47 (1954)

86. Bush, L.J., N.L. Jacobson, R.S. Allen
J. Anim. Sci. 16, 1091 (1957)

87. Brown, W.O.
J. Sci. Food Agric. 8, 279 (1957)

88. Hegeness, F.W.
J. Nutr. 68, 573 (1959)

89. Kirchgessner, M.
Diskussionsbeitrag VIII. Intern. Kongreß f. Tierzucht, Hamburg 1961

90. Kirchgessner, M., W. Oelschläger, W. Munz
Z. Tierernährung, Futtermittelkde. 15, 321 (1960)

91. Supplee, W.C., G.F. Combs
Poultry Sci. 39, 1211 (1960)

92. Howland, J.W., F. Furth, M. Coulter
Fed. Proc. 9, 334 (1950)

93. Furth, F.W., M.P. Coulter, J.W. Howland
Am. J. Pathol. 28, 25 (1952)

94. Michaelson, S., J.W. Howland
Antibiot. Ann. 283 (1955/56)

95. Rekers, E., N. Marti
Am. J. Med. Sci. 221, 191 (1951)

96. Mellen, W.J., E.F. Waller
Poultry Sci. 33, 1036 (1954)

97. Menge, H., M.H. Conner
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 88, 216 (1956)

98. Perdue, H.S., J.A. Kolar, H.C. Spruth, D.V. Frost
Arkansas Formula Feed Conference 1958

99 Schendel, H.E., B.C. Johnson
J. Anim. Sci. 12, 88 (1953)

100. Brüggemann, J., H. Karg, J. Schole
Vit. Horm. 7, 338 (1956)

101. Gschwilm, H.
Dissertation München (1956)

102. Swenson, M.J., G.K.L. Underbjerg, E.E. Bartley, W.G. Jones
J. Dairy Sci. 40, 1525 (1957)

103. Brüggemann, J., H. Karg, J. Schole
Vit. Horm. 7, 338 (1956)

104. Bateman, J.C., C.T. Klopp, R. Samson
Antibiotics Ann. 531 (1953/54)

105. Trams, E.G., H.K. Kashiwa, I. Cornman, C.T. Klopp
Antibiotics Med. 677/1 (1955)

106. Meites, J.
Metabolism 1, 58 (1952; Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 81,
307 (1952)

107. Mustakallio, K.K., A. Telkkä
Ann. Med. exp. Biol. fenniae 32, 9 (1954)

108. Hieber, C.M.
Dissertation (med.vet.) München 1958

109. Schole, J., C.M. Hieber
Vit. u. Horm. 8, 78 (1958)

110. Schole, J.
Dissertation (agr.), TH München 1955

111. Karg, H.
Habilitationsschrift 1958

112. Schole, J.
persönliche Mitteilung

113. Fleischer, W.-D.
Dissertation (med.vet.) München, in Vorbereitung

114. Rauen, H.M.
Biochem. Taschenbuch
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1964

Herrn Professor Dr. Dr. Dr. h. c. Johs. Brüggemann danke ich für die Überlassung des Themas und die guten Arbeitsbedingungen in seinem Institut.

Den Herren Privatdozenten Dr. M. Merkenschlager und Dr. Dr. J. Schole möchte ich besonders für ihr in jeder Beziehung großes Entgegenkommen und die eindrucksvolle Aufgeschlossenheit, mit der sie meinen Ansichten gegenüberstanden, danken.

LEBENSLAUF

Am 6. Januar 1939 wurde ich als Sohn des Forstamtmanns Franz Schmidt und seiner Ehefrau Olga, geb. Stricker, in Tachau (Sudetenland) geboren.

Nach der Ausweisung im Mai 1946 besuchte ich die zweiklassige Volksschule in Giesel, Kreis Fulda. Im Frühjahr 1950 wurde ich in das Städtische Realgymnasium in Fulda aufgenommen. Im Juni 1953 trat ich in das Alte Realgymnasium, jetzige Herderschule, in Gießen ein. Hier legte ich im Frühjahr 1959 die Reifeprüfung ab.

Bis Mai 1960 war ich auf Großer Fahrt bei der Deutschen Handelsmarine.

Im Sommersemester 1960 begann ich an der Tierärztlichen Fakultät der Justus-Liebig-Universität in Gießen mit dem Studium der Veterinärmedizin. Im Frühjahr 1965 bestand ich die Tierärztliche Prüfung in Gießen.

Meine Praktikantenzeit leistete ich bei Lehrtierarzt Herrn Dr. E. Schlag in Lindlar, Rheinisch-Bergischer Kreis, ab.

Zur Zeit bin ich Beschautierarzt am Städtischen Schlacht- und Viehhof München.